

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 10 月 6 日 (06.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/092960 A1

(51) 国際特許分類: **C08J 9/28 // C08L 89:00**
(21) 国際出願番号: **PCT/JP2005/005460**
(22) 国際出願日: **2005 年 3 月 17 日 (17.03.2005)**
(25) 国際出願の言語: **日本語**
(26) 国際公開の言語: **日本語**
(30) 優先権データ:
特願2004-89064 2004 年 3 月 25 日 (25.03.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): セーレン株式会社 (SEIREN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒918-8003 福井県 福井市 毛矢 1 丁目 1 〇 番 1 号 Fukui (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 加藤 洋一 (KATO, Yoichi) [JP/JP]; 〒918-8003 福井県 福井市 毛矢 1 丁目 1 〇 番 1 号 セーレン株式会社内 Fukui

(JP). 辻本 和久 (TSUJIMOTO, Kazuhisa) [JP/JP]; 〒918-8003 福井県 福井市 毛矢 1 丁目 1 〇 番 1 号 セーレン株式会社内 Fukui (JP). 山田 英幸 (YAMADA, Hideyuki) [JP/JP]; 〒918-8003 福井県 福井市 毛矢 1 丁目 1 〇 番 1 号 セーレン株式会社内 Fukui (JP).

(74) 代理人: 斉藤 武彦 (SAITO, Takehiko); 〒107-0052 東京都港区 赤坂 1 丁目 1 番 1 8 号 赤坂大成ビル Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: BIOCOMPATIBLE POROUS MATERIAL AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 生体適合性をもつ多孔質体およびその製造方法



(57) Abstract: It is intended to provide a novel porous material which is highly safe to the environment and living body, has a practically available strength and is appropriately usable as a functional material. Namely, a porous material comprising sericin with an average molecular weight of from 30000 to 400000, showing a recovery ratio after 50% compression of from 10 to 100%, preferably having an average pore size of from 0.1 to 1000 μ m and having a porosity of from 70 to 99%.

[続葉有]



WO 2005/092960 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約: 環境や生体に対する安全性が高く、実用に耐え得る強度を有し、機能性材料として好適に用いることが可能な新規多孔質体を提供する。平均分子量が30000~400000であるセリシンからなり、50%圧縮後の回復率が10~100%であり、好ましくは平均細孔径が0.1~1000 μm であり、空孔率が70~99%である多孔質体。

明 細 書

生体適合性をもつ多孔質体およびその製造方法

技術分野

本発明は生体適合性をもつ多孔質体およびその製造方法に関する。より詳しくは、環境や生体に対する安全性が高く、かつ実用に耐え得る強度を有するセリシンの多孔質体、およびその製造方法に関するものである。

背景技術

蚕から吐き出される繭糸は、結晶性の高いフィブロインと、非結晶性のセリシンという2種類の蛋白質から構成され、セリシンは2本のフィブロインを取り囲むように膠着して存在している。このうち、精練によってセリシンを取り除いた、フィブロインを主体とする繊維が、いわゆる絹糸であり、従来、セリシンは、何ら価値のないものとして破棄されてきた。

しかしながら、近年、セリシンが保湿性、抗酸化作用、細胞保護作用、蛋白質保護作用などの性質を有し、生体適合性に優れた材料であることが明らかになるに従い、セリシンを医用材料や化粧用材料など機能性材料として利用しようとする試みがさかんに行われるようになった。

例えば特開平3-284337号公報には、セリシンをホルムアルデヒドと熱反応型水溶性ウレタン樹脂で架橋薄膜化した架橋高分子分離膜が記載されている。特開平6-80741号公報には、セリシンなどの蛋白質とアクリロニトリルを乳化重合させた蛋白質含有合成高分子材料、および、セリシンなどの蛋白質と水溶性エポキシ系化合物と架橋剤を互いに結合・架橋させて三次元網状構造とした蛋白質含有合成高分子材料が記載されている。特開2001-106794号公報には、セリシンとポリビニルアルコールとのブレンド物を、架橋剤により架橋不溶化した高分子含水ゲルが記載されている。特開2002-201363号公報には、セリシンとポリビニルアルコール系の水溶性樹脂からなる、溶融熱成形可能な複合樹脂が記載されている。

しかしながら、これらはいずれも、合成高分子材料を用いてセリシンを難溶化あるいは不溶化したり、合成高分子材料にわずかながらのセリシンの性質を付与したりするものであり、環境や生体に対する安全性が十分でなく、機能性材料、特に医用材料として用いるには限界があった。

これに対し、例えば特開平11-228837号公報には、絹蛋白質とコラーゲンの混合水性溶液または混合水性分散液を蒸発乾燥し、固化して得られる絹蛋白質／コラーゲン複合体が記載されている。特開2003-192807号公報には、絹蛋白質水溶液を不活性雰囲気条件で乾燥して得られる絹蛋白質キャストフィルムが記載されている。そして、絹蛋白質はセリシンおよびフィブロインの少なくともいずれかであると説明されている。

これらは確かに、前述の安全性の問題を一見克服するものであるが、特開平11-228837号公報に言及すれば、市場にあるコラーゲンの多くは牛皮革に由来するものであり、狂牛病などの問題が取り沙汰される昨今、その使用が控えらる傾向にある。

さらに、特開平11-228837号公報 および特開2003-192807号公報において絹蛋白質は、実質上、フィブロイン単独、あるいはフィブロインとセリシンの混合物であり、絹蛋白質としてセリシンを単独で用いても、実用に耐え得る強度を有する複合体、あるいはキャストフィルムを得ることはできなかった。

またセリシンの粉末を取得する等の目的でセリシンを凍結乾燥処理等に供することも行われている。しかしセリシン単独を多孔質体の骨格構成成分として用いて実用に耐える構造安定性をもつ多孔質体とする試みは未だなされていない。

発明の目的

本発明はこのような現状に鑑みてなされたものであり、その目的とするところは、環境や生体に対する安全性が高く、かつ実用に耐え得る強度を有し、機能性材料として好適に用いることが可能なセリシンの多孔質体、およびその製造方法を提供することである。

発明の開示

すなわち、本発明は、第1に多孔質体の骨格構成成分が平均分子量が30000～400000であるセリシンからなり、50%圧縮後の回復率が10～100%であることを特徴とする多孔質体である。

本発明の多孔質体は、平均細孔径が0.1～5000 μ mであることが好ましく、また空孔率が70～99%であることが好ましい。

本発明の多孔質体は必要に応じ機能性物質を固定化した状態で存在させることができる。

本発明は、第2に、平均分子量が30000～400000であるセリシンを含む水溶液をゲル化後、凍結し、次いで融解させることを特徴とする、多孔質体の製造方法である。

本発明によれば、環境や生体に対して悪影響を及ぼす虞のある化合物を用いることなく、基本的にはセリシン単独から、実用に耐え得る強度を有する多孔質体を提供することができる。また、この多孔質体に機能性物質を含有させることにより、多孔質体に新たな機能性を付与することができるとともに、含有させた機能性物質を物理的に安定化して固定することができる。しかも凍結などのストレスにより起こり得る機能性物質の失活を抑制することができる。本発明により提供される多孔質体は、医用材料や化粧用材料、食品材料、環境適合材料などの機能性材料、具体的には、再生医工学素材や細胞マトリックス、バイオセンサー、バイオリアクター、保湿材、保温材、微生物固定担体、医薬品の貼付剤、土壌改良剤などとして、好適に用いることができる。

発明の実施の態様

以下、本発明について詳細に説明する。

多孔質体を構成するセリシンの平均分子量は、30000～400000であることが要求される。平均分子量が30000未満であると、実用的強度を有するセリシン多孔質体を構成することができない。平均分子量が400000を越えると水に溶解し難く操作性が悪い。より好ましい平均分子量は40000～200000であり、さらに好ましくは60000～100000である。なお、本発明におけるセリシンの分子量あ

るいは平均分子量は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）により測定した値である。本発明において用いられるセリシンは、分子量が30000～400000のセリシンが70～100%を占めることが好ましく、より好ましくは95～100%、さらに好ましくは99～100%である。またセリシンの純度は、90～100%であることが好ましく、より好ましくは95～100%、さらに好ましくは99～100%である。ここで、純度とは、分離精製して得られるセリシン水溶液に含まれる固形分、あるいは乾燥して得られる固形分に占めるセリシンの割合をいう。これら固形分は、フィブロインなどの蛋白質やアミノ酸、糖、脂質、核酸、色素などの繭あるいは蚕由来成分の他、塩などの不純物をわずかに含むものである。

本発明において用いられるセリシンは、平均分子量が30000～400000である限り、天然物由来のものであっても、人工的に合成されたものであってもよく、いずれのものであっても包含される。したがって、セリシンは化学合成されたものであっても、または遺伝子工学的手段により得られたものであってもよいが、本発明においてセリシンは、天然物由来のものであることが好ましい。天然物由来であると、生体への安全性が高く、また比較的容易に調製できるため、有利である。また、本発明においてセリシンという場合、セリシン蛋白質そのものの他に、該蛋白質の加水分解物をも包含するものとする。

本発明の好ましい態様によれば、セリシンは、蚕が吐出する繭糸、または生糸から溶媒によって抽出したもの、あるいは物理的に剥離したものが用いられる。あるいは、蚕体内より取り出した絹糸腺内のセリシンを用いることも可能である。なおここで繭とは蚕繭のことをいい、また生糸とは蚕繭を温湯に浸して蚕繭から繰り出して得られる繭糸のことである。

本発明において用いられる蚕としては、人間に飼育されて生育する家蚕、自然環境の中で生育する野蚕のいずれも使用可能であり、特別な種類に限定されない。繭は蛹が入っている状態のもの、または繭の一部を切開して蛹を取り出した状態のもの、もしくは粉碎処理したもの、また生糸についても製糸したもの、織り、編みなどにより布帛化したもの、縫製したもの、もしくは粉碎処理したものなどいずれも使用可能である。

上記材料からセリシンを得るための抽出溶媒としては、水、尿素水溶液、含水アルコールなどの親水性溶媒が挙げられる。例えば、家蚕繭をその10～30倍量の水で煮沸処理することにより、セリシンを水中に溶出させる。このとき、必要に応じて電気分解した水や、酸、アルカリまたは酵素を併用してセリシンを部分加水分解させてもよい。さらに、加圧下で処理してもよい。前述のように、本発明において用いられるセリシンの平均分子量は30000～400000であることが要求され、このようなセリシンを効率よく抽出するには、アルカリなどを含まない熱水にて抽出することが好ましい。熱水抽出によれば、セリシンを比較的高分子量のままで抽出することができ、また、その抽出液はアルカリなどを含まないため、分画、脱塩などの操作は特に不要であり、夾雑物を除去した後は、必要に応じて濃縮後、そのままセリシン水溶液として、後述する多孔質体の製造に供することができる。

セリシンを含む抽出液から夾雑物を除去するには、ろ過、遠心分離など公知の方法を採用することができる。

さらに、必要に応じて、得られた抽出液を分離精製する。ここで用いられる分離精製法は、特に限定されるものではなく、例えば塩析、有機溶媒沈殿、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、逆浸透、限外ろ過、超遠心分離、電気透析などの公知の方法を単独で、あるいは組み合わせて用いるこ

とができる。さらに、凍結乾燥、噴霧乾燥 などにより乾燥してもよい。これらの工程の条件を調節することにより平均分子量 30000～400000 のセリシンが取得される。

本発明の多孔質体の製造において用いられるセリシン水溶液は、上記抽出液、あるいはその分離精製物であることができる。また、乾燥して得られる固体セリシンを、水に溶解して調製したものであってもよい。後述するように、セリシン水溶液は、ゲル化特性を満足して調製される限り、ある温度以下になるとゲル化するため、セリシン水溶液が液体としての性状を保つには、それを上まわる温度に維持しなければならない。ただし、たとえゲル化しても、加温により容易に液体としての性状を回復することができる。なお、ゲル化温度は、セリシンの分子量や濃度によって大きく異なるため、一概に特定することはできない。

本発明の多孔質体は、上記セリシン水溶液から、セリシンを多孔質状に析出させて得られる構造体であって、50%圧縮後の回復率は10～100%であることを特徴とするものである。50%圧縮後の回復率が10%未満であると、強度に乏しく実用に耐えることができない。より好ましい回復率は20～100%である。

本発明の多孔質体はその骨格構造が実質的にセリシンのみから形成されていることが好ましい。

本発明の多孔質体の平均細孔径は、通常0.1～5000 μ mの範囲であり、実用的強度を有する限り、そのいずれも機能性材料として使用可能である。平均細孔径が0.1 μ m未満であると十分な通水性が得られない。平均細孔径が1000 μ mを越えると機能性物質を安定に固定できなくなるおそれがある。好ましい平均細孔径は0.1～1000 μ mであり、より好ましい平均細孔径は1～500 μ mである。

ここで、平均細孔径は、細孔50個を任意に選択し、各細孔について直線的に最長となる径を測定して平均値を算出したものである。

本発明の多孔質体の空孔率は、1～99.5%の範囲であることができ、実用的強度を有する限り、そのいずれも機能性材料として使用可能であるが、好ましくは空孔率70～99%の多孔質体である。空孔率が70%未満であると十分な通水性が得られない。空孔率が99%を越えると実用的強度を得ることができない。より好ましい空孔率は85～98%である。

なお、本発明でいう多孔質体の空孔率とは、多孔質体を水に浸漬し、細孔部に水を最大限保持させた状態の多孔質体の重量(A)と、50℃で6時間乾燥させた後の多孔質体の重量(B)を測定し、次式により算出したものである。

$$\text{空孔率}(\%) = [(A - B) / A] \times 100$$

本発明の多孔質体は、水への溶解性が低いため、細孔部に水を保持させた状態で使用することが可能である。多孔質体の水分保持量は、用途に応じて適宜設定すればよい。

次に、本発明の多孔質体の製造方法について説明する。

本発明の多孔質体は、平均分子量が30000～400000であるセリシンを含む水溶液から、セリシンを多孔質状に析出させることにより製造することができる。好ましい態様によれば、セリシン水溶液をゲル化後、凍結し、次いで融解させる方法によることができる。

この方法において特徴的であるのは、セリシン水溶液を、一旦ゲル化し、しかる後に、凍結、融解させることである。セリシン水溶液をゲル化工程を経ることなく、凍結、融解して得られる多孔質体は、非常に脆く、その構造を維持することができない。得られる多孔質体の細孔径や空孔率の前記した好ましい範囲への制御は、セリシン水溶液の濃

度や、ゲル化時の空気量、セリシengel中の気泡サイズ、凍結時の冷却速度などを制御することにより、行うことができる。

セリシン水溶液のゲル化は、目的とする形状の多孔質体を得るに適当な容器中、セリシン水溶液を冷却および／または濃縮し、ゲル化温度以下に維持することにより達成される。このとき、セリシン水溶液を予め0.5～20重量%の濃度に調整しておく、セリシン水溶液を冷却するだけでゲル化させることができ、効率的である。セリシン濃度が0.5重量%未満であると、0℃まで冷却してもゲル化せず、セリシン水溶液がそのまま凍結してしまい、目的とする多孔質体を析出させることができない。また、セリシン濃度が20重量%を越えると、高温でゲル化するため操作性が悪く、目的とする形状に制御し難い。より好ましいセリシン濃度は、1～10重量%である。目的とする形状は特に制限されず、シート状、円柱形、立方体、球形など用途に応じた適宜の形状を選択可能である。

また、セリシン水溶液を濃縮することにより、ゲル化温度を上昇させることができるため、これによってセリシン水溶液をゲル化させることもできる。セリシン水溶液を濃縮する方法としては、限外濾過膜や、エバポレーターを用いた方法などを挙げることができる。

セリシン水溶液のゲル化に要する時間は、セリシン水溶液が十分にゲル化する時間であり、セリシン水溶液の濃度や液量、容器の形状や材質、冷却温度や冷却方法（空气中、冷媒中など）などによって異なる。例えば、熱水抽出により得られた5重量%のセリシン水溶液を、プラスチック容器中、室温（約25℃）に放置して冷却しゲル化させる場合に、直径1cm、高さ10cmの円柱形（約8cm³）にセリシン水溶液をゲル化させるのに要する時間は0.5～1時間であり、直径9cm、高さ15cmの円柱形（約954cm³）では1～2時間であり、短辺10cm、長辺100cm、高さ1cmのシート状（1000cm³）では0.5～1時間であるが、それを越える時間放置しても、特段の問題は生じない。

次いで、セリシengelを0℃より低い温度に冷却し、凍結させる。冷却により、セリシengelに含まれる水が凍結し、氷の結晶が形成されるとともに、セリシンが多孔質状に析出する。このように析出した多孔質体が、実用的強度を有する理由は定かでないが、氷結晶の成長により、セリシengel中に存在するセリシン蛋白質が変性し、セリシン分子間に新たな結合が形成されるためと推定される。

凍結される温度（以下、凍結温度と称する）は特に限定されるものでなく、セリシengelが凍結する温度であればいかなる温度であっても構わないが、実用的には、通常のフリーザーを用いて-80～-3℃で凍結させるのがよい。通常のフリーザーで冷却可能な温度が-80℃程度である。また、凍結温度が-3℃より高いと、凍結に長時間を要し、セリシン濃度が高いものでは凍結が起こらない。より好ましい凍結温度は-80～-30℃である。

凍結の際には、ドライアイス-メチルアルコール、液体窒素など公知の冷却剤を用いてもよい。

セリシengelの凍結に要する時間は、セリシengel中の水が十分に凍結し、セリシンが析出する時間であればよく、セリシengelの濃度や容量、容器の形状や材質、冷却温度や冷却方法（空气中、冷媒中など）などによって異なる。例えば、プラスチック容器中、室温（約25℃）でゲル化させたセリシengelを、-30℃のフリーザー中に放置して冷却し凍結させる場合、直径1cm、高さ10cmの円柱形（約8cm³）では0.5～2時間を要し、直径9cm、高さ15cmの円柱形（約954cm³）では3～6

時間を要し、短辺10 cm、長辺100 cm、高さ1 cmのシート状(1000 cm³)では0.5~2時間を要するが、それを越える時間放置しても、特段の問題は生じない。

凍結の際の冷却速度を制御することにより、前記したように、多孔質体の細孔径を調整することができる。例えば、液体窒素などを用いて急速冷却すると、-30℃のフリーザーを用いて緩慢冷却した場合よりも細孔径の小さなセリシン多孔質体を得ることができる。

次いで、凍結させたセリシングル（この段階で、その内部にはセリシン骨格からなる多孔質体が、細孔部に氷結晶を保持した状態で析出している）を0℃以上に放置することにより、融解させる。融解させる温度（以下、融解温度と称する）は特に限定されるものではなく、凍結セリシングルが融解する温度であればいかなる温度であっても構わないが、好ましくは0~80℃であり、より好ましくは4~40℃である。融解温度が0℃より低いと、融解に長時間を要し、セリシン濃度が低いものでは融解が起こらない。融解温度が80℃を越えると、多孔質体は水に溶解してしまう。凍結させたセリシングルの融解に要する時間は、凍結セリシングル中の氷が十分に融解する時間であればよく、セリシングルの濃度や容量、容器の形状や材質、融解温度や融解方法（空气中、溶媒中など）などによって異なる。例えば、プラスチック容器中、-30℃で凍結させたセリシングルの、室温（約25℃）に放置して融解させる場合、直径1 cm、高さ10 cmの円柱形（約8 cm³）では1~2時間を要し、直径9 cm、高さ15 cmの円柱形（約954 cm³）では6~12時間を要し、短辺10 cm、長辺100 cm、高さ1 cmのシート状（1000 cm³）では1~2時間を要するが、それを越える時間放置しても、特段の問題は生じない。

かくして、細孔部に多量の水を保持した状態の、多孔質体を得ることができる。この多孔質体を圧縮したり、あるいはタオルや吸水性物質を接触させたりすることにより、細孔部の水を除去することができる。前述の通り、多孔質体の水分保持量は、用途に応じて適宜設定すればよい。なお、水分保持量を適宜調整後、多孔質体を加熱し、溶解させることにより、濃縮されたセリシン水溶液を調製することができる。

多孔質体は乾燥により、あるいは、水分保持量が低くなるに従い、収縮し、空孔率が低下するとともに、柔軟性が損なわれる傾向にある。多孔質体中の水をメタノールやエタノールなどのアルコールで置換することにより乾燥による収縮を抑えることが可能であり、空孔率が高く、溶媒保持量の低い多孔質体が求められる場合は、このように処理することが好ましい。

このようにして得られる多孔質体の50%圧縮後の回復率は、通常、10~100%の範囲内にあり、前記条件を満足するものである。

本発明の多孔質体は、柔軟でありながらも、弾性に富み、強く握りしめても、一時的には変形するが、圧力から解放されると形状を回復することができる。さらに、水への溶解性が低いなど、機能性材料として実用に耐え得る強度を有したものである。

また、多孔質体の細孔径や空孔率は、前記したように、セリシン水溶液の濃度やゲル化時の空気量、セリシングル中の気泡サイズ、凍結時の冷却速度などを制御することにより、調整することができるが、多孔質体析出後の圧縮や収縮による調整も可能である。

本発明の多孔質体は、各種機能性物質を物理的に安定化して固定することができる。機能性物質としては、例えば、抗体や酵素などのポリペプチド、核酸、多糖類、ビタミンなどの生体由来物質を挙げることができる。これらが2種類以上組み合わせられていてもよい。

本発明の多孔質体は、凍結などのストレスにより起こり得る機能性物質の失活を抑制

することができるため、例えば凍結感受性の高い酵素を固定させる場合にも有効である。

このような機能性物質は、セリシン水溶液を調製する際、セリシン水溶液に溶解あるいは分散させることにより、多孔質体に均一に固定させることができる。

さらに、本発明の多孔質体は、繊維や樹脂成形体などの構造体との複合体であることもできる。このような複合体は、構造体をセリシン水溶液に浸漬させた状態で、セリシンを析出させることにより、容易に調製することができる。複合体に機能性物質を固定させてもよいことは言うまでもない。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

実施例 1

蛹を除去した家蚕繭 100 g をイオン交換水 1 リットルに浸漬し、オートクレーブを用いて 105℃ で 30 分間加熱処理した。得られた抽出液をガラスフィルター（東洋濾紙（株）製、ADVANTEC GA-100）でろ過して夾雑物を除去し、約 1 重量% のセリシン水溶液を得た。

なお、得られたセリシンの分子量を SDS-PAGE により測定した結果、平均分子量は約 100000 であった。

得られたセリシン水溶液 1.0 ml をマイクロチューブ（1.5 ml）に注ぎ、室温（約 25℃）で 1 時間静置してセリシン水溶液をゲル化させた後、-30℃ で 15 時間静置してセリシゲルを凍結させた。次いで室温で 6 時間静置して融解させ、マイクロチューブから取り出して、細孔部に水を保持した状態の、空孔率約 97% の多孔質体を得た。

得られた多孔質体をエタノールに浸漬し水を置換した後、乾燥し、電子顕微鏡で観察した結果、10~400 μm（平均孔径 110 μm）の細孔が形成されていた。電子顕微鏡写真を図 1 に示す。

また、細孔部に水を保持した状態の多孔質体について、溶解性（温度安定性、pH 安定性）を評価した結果を表 1 および表 2 に示す。評価方法は次の通りである。

溶解性（温度安定性）

多孔質体を pH 7.0 の 50 mM 磷酸緩衝液 0.5 ml に浸漬して、4℃、25℃、37℃、50℃、60℃、80℃ の各温度で 1 時間静置した。浸漬液を 0.45 μm シリンジフィルター（旭テクノグラス（株）製）でろ過して夾雑物を除いた後、BCA 法（PIERCE 社製、Micro BCA™ Protein Assay Reagent）により、浸漬液の蛋白質濃度を測定した。加熱により多孔質体を完全溶解させたときの蛋白質濃度を溶解率 100% として、多孔質体の溶解率を求めた。

溶解性（pH 安定性）

多孔質体を pH 1.7、pH 4.5 の 50 mM 塩酸緩衝液 0.5 ml に、また、pH 6.0、pH 7.0、pH 8.0 の 50 mM 磷酸緩衝液 0.5 ml にそれぞれ浸漬して、25℃ で 1 時間静置した。浸漬液を 0.45 μm シリンジフィルター（旭テクノグラス（株）製）でろ過して夾雑物を除いた後、BCA 法（PIERCE 社製、Micro BCA™ Protein Assay Reagent）により、浸漬液の蛋白質濃度を測定した。加熱により多孔質体を完全溶解させたときの蛋白質濃度を溶解率 100%

として、多孔質体の溶解率を求めた。 実施例 2

実施例 1 で得られた約 1 重量%のセリシン水溶液 25 ml をコニカル底プラスチックチューブ (50 ml) に注ぎ、これ以降は実施例 1 と同様にして、細孔部に水を保持した状態の多孔質体を得た。得られた多孔質体を絞って水分を減少させ、加熱して多孔質体を再溶解させた後、イオン交換水を加えて容量を 100 ml に調整し、セリシン濃度約 2.5 重量%の水溶液を得た。

このようにして得られた約 2.5 重量%のセリシン水溶液を用いた以外は、実施例 1 と同様にして、細孔部に水を保持した状態の、空孔率約 95%の多孔質体を得た。

得られた多孔質体について、実施例 1 と同様にして、溶解性 (温度安定性、pH 安定性) を評価した結果を表 1 および表 2 に示す。

表 1

温度 (°C)	溶解率 (%)	
	実施例 1	実施例 2
4	≤ 1	≤ 1
25	≤ 1	≤ 1
37	5.0	≤ 1
50	24.4	4.7
60	31.2	5.9
80	62.7	41.9

表 2

pH	溶解率 (%)	
	実施例 1	実施例 2
1.7	≤ 1	≤ 1
4.5	≤ 1	≤ 1
6.0	≤ 1	≤ 1
7.0	≤ 1	≤ 1
8.0	≤ 1	≤ 1

実施例 3

実施例 1 で得られた約 1 重量%のセリシン水溶液 640 ml をビーカー (1 リットル) に注ぎ、これ以降は実施例 1 と同様にして、細孔部に水を保持した状態の多孔質体を得

た。得られた多孔質体を絞って水分を減少させ、加熱してセリシン多孔質体を再溶解させた後、イオン交換水を加えて液量を80mlに調整し、セリシン濃度約8重量%の水溶液を得た。さらに、これを希釈して、セリシン濃度約2重量%の水溶液40ml、同じく約6重量%の水溶液40mlを得た。

このようにして得られた約2重量%、約6重量%、約8重量%のセリシン水溶液25mlをそれぞれコニカル底プラスチックチューブ（50ml）に注ぎ、これ以降は実施例1と同様にして、細孔部に水を保持した状態の多孔質体を得た。多孔質体の空孔率は、それぞれ約96%、約89%、約86%であった。

得られた多孔質体をエタノールに浸漬し、細孔部にエタノールを保持した状態の多孔質体について、50%圧縮後の回復率を評価した結果を表3に示す。評価方法は次の通りである。

50%圧縮後の回復率

半径2.4cm、高さ3.0cmの円柱形の多孔質体を採取し、オートグラフを用いて、圧縮速度30mm/minで高さ比50%まで圧縮した後、同じ速度で徐圧する。徐圧後に多孔質体の高さを測定し（このときの高さをHとする）、次式により回復率を求めた。

$$\text{回復率 (\%)} = [(H - 1.5) / 1.5] \times 100$$

表 3

セリシン濃度 (%)	圧縮回復率 (%)
2	25
6	50
8	75

比較例 1

蛹を除去した家蚕繭1kgを、0.2重量%炭酸ナトリウム水溶液（pH11~12）50リットルに浸漬し、95℃で2時間加熱処理することにより、セリシンを加水分解させ、抽出した（以下、セリシン加水分解物を、単に、セリシンと称する場合もある）。得られた抽出液を平均孔径0.2μmのフィルターでろ液して夾雑物を除去した後、ろ液を逆浸透膜により脱塩し、約0.2重量%の無色透明セリシン水溶液を得た。次いで、この水溶液をエバポレーターを用いてセリシン濃度が約2重量%になるまで濃縮した後、凍結乾燥処理を行って、セリシン加水分解物の粉体100gを得た。なお、得られたセリシン加水分解物の分子量をSDS-PAGEにより測定した結果、平均分子量は約20000であった。

このセリシン粉体をイオン交換水に溶解して、20重量%のセリシン水溶液を得た。セリシン水溶液1.0mlをマイクロチューブ（1.5ml）に注ぎ、室温（約25℃）で1時間静置したところ、セリシン水溶液のゲル化は起こらなかった。その後、-30℃で15時間静置してセリシン水溶液を凍結させた。次いで室温で6時間静置して融解させたが、目的とする多孔質体の析出は認められなかった。

実施例 4

チロシナーゼを多孔質体に固定させた。すなわち、実施例2で得られた約2.5重量%のセリシン水溶液1.0mlに、マッシュルーム由来チロシナーゼ粉体（Sigma社製）100unitsを混合したものを空カラム（2.5ml）に注ぎ、氷水中で1時間静置して混合水溶液をゲル化させた後、-30℃で15時間静置して混合ゲルを凍結させた。次いで4℃で6時間静置して融解させ、チロシナーゼ固定多孔質体が充填されたカラムを得た。得られたカラムを、pH7.0の50mM磷酸緩衝液10mlで洗浄し、未固定のチロシナーゼを除去し、評価試験1、2に供した。

評価試験1

カラムに、基質として0.1重量%D-チロシン水溶液1.0mlをカラム上部より添加し、室温（約25℃）で1時間反応させた後、カラム上部より加圧して、カラム下部より反応液を回収した。

比較対照として、チロシナーゼ100unitsをpH7.0の50mM磷酸緩衝液1.0mlに溶解したものを、0.1重量%D-チロシン水溶液1.0mlに添加し、室温で1時間反応させた。

チロシナーゼの活性は、生成したドーパキノンの量を475nmにおける吸光度を測定することにより求めた。結果を表4に示す。

表4

	吸光度	相対比 (%)
多孔質体に固定させた酵素	0.161	87
比較対照	0.186	100

表3から明らかなように、本発明のセリシン多孔質体は、チロシナーゼを失活させることなく固定することができた。

評価試験2

カラムに、基質として0.1重量%D-チロシン水溶液100mlをカラム上部より流速1.0ml/minで浸透させ、カラム下部より反応液を5mlずつ回収した。酵素反応は室温（約25℃）にて行った。

透過開始～5ml、45～50ml、95～100mlで回収された反応液各5mlについて、評価試験1と同様にしてチロシナーゼの活性を求め、透過開始直後の活性を100%として、活性維持率を求めた。結果を表5に示す。

表5

透過液 (ml)	吸光度	活性維持率 (%)
透過開始～5	0.121	100
45～50	0.127	105
95～100	0.111	92

表5から明らかなように、本発明の多孔質体は、基質溶液100ml透過後も、90%以上の活性を維持した状態でチロシナーゼを固定していた。

図面の簡単な説明

図1は本発明の多孔質体の電子顕微鏡写真である。

請求の範囲

1. 多孔質体の骨格構成成分が平均分子量が30000～400000であるセリシンからなり、50%圧縮後の回復率が10～100%であることを特徴とする多孔質体。
2. 平均細孔径が0.1～5000 μm であることを特徴とする請求項1に記載の多孔質体。
3. 空孔率が70～99%であることを特徴とする請求項1または2に記載の多孔質体。
4. 機能性物質が固定されていることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の多孔質体。
5. 機能性物質が生物由来物質である請求項4に記載の多孔質体。
6. 平均分子量が30000～400000であるセリシンを含む水溶液をゲル化後、凍結し、次いで融解させることを特徴とする多孔質体の製造方法。

1 / 1

第1図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005460

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁷ C08J9/28//C08L89:00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁷ C08J9/28//C08L89:00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2000-106868 A (Director General of National Institute of Sericultural and Entomological Science Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries), 18 April, 2000 (18.04.00), Claims; Par. Nos. [0024] to [0025] (Family: none)	1-6
A	JP 2004-2521 A (Nishikawa Rubber Co., Ltd.), 08 January, 2004 (08.01.04), Claims; Par. No. [0009] (Family: none)	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 June, 2005 (20.06.05)

Date of mailing of the international search report

05 July, 2005 (05.07.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005460

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2000-38514 A (Director General of National Institute of Sericultural and Entomological Science Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries), 08 February, 2000 (08.02.00), Claims (Family: none)	1-6
A	JP 1-254621 A (Terumo Corp.), 11 October, 1989 (11.10.89), Claims (Family: none)	1-6
A	JP 2003-214766 A (Kashiro Sangyo Kabushiki Kaisha), 30 July, 2003 (30.07.03), Claims (Family: none)	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷

C08J9/28 // C08L89:00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷

C08J9/28 // C08L89:00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P 2000-106868 A (農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所長) 2000.04.18, 特許請求の範囲, 【0024】～【0025】 (ファミリーなし)	1-6
A	J P 2004-2521 A (西川ゴム工業株式会社) 2004.01.08, 特許請求の範囲, 【0009】 (ファミリーなし)	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.06.2005

国際調査報告の発送日

05.7.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 靖恵

電話番号 03-3581-1101 内線 3457

4 J

9553

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2000-38514 A (農林水産省蚕糸・昆虫農業技術 研究所長) 2000.02.08, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-6
A	JP 1-254621 A (テルモ株式会社) 1989.10.11, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-6
A	JP 2003-214766 A (カシロ産業株式会社) 2003.07.30, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-6